

PCT

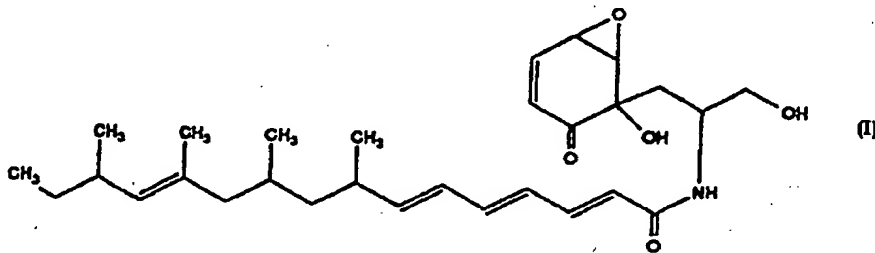
世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07D 303/36, C12P 17/02, A61K 31/335	A1	(11) 国際公開番号 WO95/18119
		(43) 国際公開日 1995年7月6日(06.07.95)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02202</p> <p>(22) 国際出願日 1994年12月26日(26.12.94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/330613 1993年12月27日(27.12.93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三共株式会社(SANKYO COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 荻田健(OGITA, Takeshi)[JP/JP] 奈良太(NARA, Futoshi)[JP/JP] 丹沢和比古(TANZAWA, Kazuhiko)[JP/JP] 〒140 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo, (JP) 細矢剛(HOSOYA, Tsuyoshi)[JP/JP] 古谷航平(FURUYA, Kouhei)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市御幸が丘33 三共株式会社内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 中村稔, 外(NAKAMURA, Minoru et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, CZ, FI, HU, KR, NO, NZ, RU, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title : NOVEL COMPOUND F-10463a

(54) 発明の名称 新規化合物F-10463a

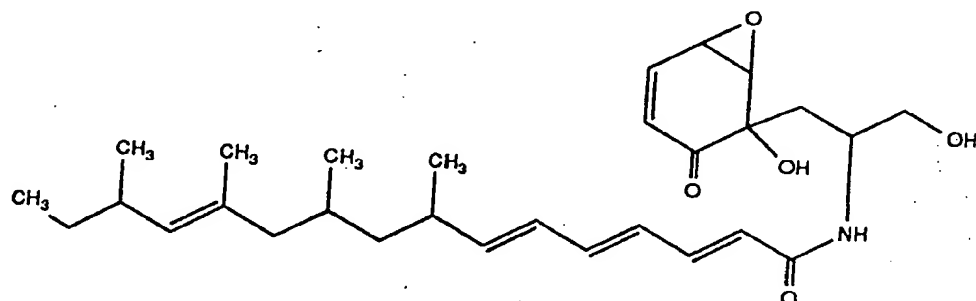


(57) Abstract

A novel compound F-10463a represented by formula (I). It is useful as an anti-HIV drug, antidiabetic, antiarteriosclerotic, antiosteoporotic, antithrombotic, anti-inflammatory, immunosuppressant, diuretic, and a preventive or remedy for respiratory disease, thyroid disease, Alzheimer's disease, hepatitis, nephritis, leukemia, and cachexia.

(57) 要約

本発明は、下記式で表わされる新規化合物 F-10463a :



を提供するものである。

本発明の新規化合物 F-10463a は、抗HIV剤、抗糖尿病剤、抗動脈硬化剤、抗骨粗しょう症剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、利尿剤、そして、呼吸器系疾患、甲状腺疾患、アルツハイマー病、肝炎、腎炎、白血病、及びカケクシアに対する予防薬、治療薬として使用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RD	ロンドン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	ガブリリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IS	アイスランド	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KR	韓国	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク			PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

新規化合物 F-10463a

「技術分野」

本発明は、スフィンゴミエリナーゼを阻害し各種医薬として有用な新規化合物 F-10463a およびその製造法に関する。

「背景技術」

インターロイキン-1 β （以下、「IL-1 β 」という。）の生物作用は多様であり、一般には生体の恒常性維持に必須な生体物質と考えられている。ところが、IL-1 β の産生調節機能に異常が発生し、IL-1 β が過剰に生産されると、種々の疾患の原因となる。また、腫瘍壊死因子- α （以下、「TNF- α 」という。）はある種の腫瘍細胞やウイルス感染細胞を死滅させたり、顆粒球の抗菌性作用を増強させる等の作用を有するが、TNF- α も過剰に生産された場合には、幾つかの疾患の主要な病因となる。

この二つのサイトカインは全く異なる遺伝子の産物で、その構造に類似性はなく、各々に対応した独自の受容体を有するが、それらの標的細胞、生物活性には重複する点が多い。例えば、両サイトカインは生体内に入ったエンドトキシン（LPS）によって起こる敗血症性ショックの主要原因であり [Tracy K.J. et al. Science, 234, 470 (1986)、Tracey K.J. et al. Nature (London), 330, 662 (1987)]、その他、肉芽腫 [Kobayashi K. et al. J. Immunol., 134, 358 (1985)]、髄膜炎菌髄膜炎やマラリア感染 [Curfs J.H.A. et al. J. Exp. Med., 172, 1287 (1990)] 等、外来性の微生物、寄生虫及びウイルス等に由来する感染症に密接に関係する。この様な急性期炎症反応に於ける主要な各段階、即ち、局所への炎症細胞の浸潤 [Gamble J.R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 8667 (1985)、宮坂 昌之ら Annual Review 免疫 '91, 57 中外医学社 (1991)]、発熱 [Dinarello C.A. Lymphokines, 14, 1 (1987)]、急性期蛋白の誘導 [Perimutter D.H. et al. J. Clin. Invest., 78, 1349 (1986)]、プロスタノイド、特に PGE₂ 産生の促進に [Dayer J.-M. et al. J. Exp. Med., 162, 2163 (1985)、Turinsky J. et al. Am. J. Physiol. 262, E476 (1992)、Ballou L.R. et al. J. Biol. Chem. 267, 20044 (1992)]、両サイトカインは積極的な役割を担っ

ている。

また、 $IL-1\beta$ と $TNF-\alpha$ は慢性の炎症疾患、例えば、慢性関節リウマチ（RA）発症及び進展に関与し、滑膜組織に於けるリンパ球浸潤の活性化、滑膜細胞の増殖促進、及び軟骨細胞の破壊、破骨細胞の活性化による骨吸収の促進作用を示す [Mizel S.B. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 78, 2474 (1980) , Miyasaka N. et al. Arthritis Rheum., 31, 480 (1988), Arend W.P. and Day er J.-M. Arthritis Rheumatism., 33, 305 (1990)]。その他、同じリウマチ性疾患である膠原病 [Tanaka Y. et al. J.Immunol., 143, 1584 (1989)]、全身性血管炎を主体とする川崎病 [Leung D.Y.M. et al. J.Exp.Med., 164, 1958 (1986)]、肉芽腫とそれに続く線維症に伴う慢性炎症にも関わるということが知られている [Le J. and Vilcek J. Lab.Invest., 56, 234 (1987)]。現在、慢性炎症性疾患の治療剤として使用されているグルココルチコイドは、その作用一部がこれらサイトカインの産生抑制にあることが知られているが [Lew W. et al. J.Immunol., 140, 1895 (1988)]、グルココルチコイドは、その多様な生理作用により種々の危篤な副作用を誘起する不利を併せ持つ。

さらに、 $IL-1\beta$ と $TNF-\alpha$ は単球の血管内皮細胞への接着、内皮下への遊走 [Pober J.S. et al. J.Immunol., 137, 1893 (1986), Nelken N.A. et al. J.Clin.Invest. 88, 1121 (1991)]、血管平滑筋細胞の内膜での異常増殖を促進する等 [Raines E.W. et al. Science 243, 393 (1989)]、粥状動脈硬化の発症、進展に関与する。

また、 $IL-1\beta$ と $TNF-\alpha$ は、血小板活性化因子（PAF）の産生促進、組織因子の内皮細胞膜表面への誘導、トロンボモジュリンプロテインCの減少、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1の産生抑制をきたし、全体として血小板凝集と血液凝固を招来して血栓形成の原因となる [Bevilacqua M.P. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 83, 4533 (1986), Le J. and Vilcek J. Lab.Invest., 56, 234 (1987), 佐藤 靖史 現代医療, 23, 3163 (1991)]。

インスリン依存型糖尿病（IDDM）では、その発症に至る過程に潜在的、慢性的、自己免疫的な炎症が膵島、特に膵 β 細胞に起こっているが、 $IL-1\beta$ や $TNF-\alpha$ はそれに関与する [Nerup J. et al. Diabetes Care., 11, 16 (1988)

）。一方、インスリン非依存型糖尿病（NIDDM）に際しても、TNF- α は脂肪細胞での産生を介して筋肉、肝細胞に作用し、インスリン抵抗性を発揮することに関与する [Spiegelman B.M. et al. J. Biol. Chem., 268, 6823 (1993)]。

糸球体腎炎発症の主体を成すメサンギウム細胞の増殖と基質の増生にIL-1 β とTNF- α は深く関与する [Werber H.I. et al. J. Immunol., 138, 3207 (1987)、Baud L. et al. Kidney Int., 41, 600 (1992)]。

IL-1 β やTNF- α はT細胞からのIL-2産生やその分泌、その受容体発現を促し、また、その他の免疫細胞に作用してその働きを高めることで免疫能を賦活化する [Gillis S. and Mizel S.B. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1133 (1981)、Scheurich P. et al. J. Immunol., 138, 1786 (1987)]。この作用により両サイトカインは、例えば移植の際に生じる移植片対宿主病（GVHD）発症の一因となる。

TNF- α は、慢性の感染症やガン患者に於いて脂肪細胞のリボプロテインリパーゼ活性を抑制して食欲不振を引き起こすことにより、極度の体重減少・消耗を引き起こし（cachexia）、そのためTNF- α はカケクチン（cachectin）と呼ばれている [Beutler B. et al. Nature (London), 316, 552 (1985)]。

TNF- α は、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）感染細胞において、染色体内に挿入されたHIVのウイルスゲノム末端：LTR：からの転写を転写因子NF- κ Bを介して活性化させ、HIVの増殖をこう進させる [Nabel G. et al. Nature, 326, 711 (1987)、Schreck R. et al. EMBO Journal, 10, 2247 (1991)]。

その他、IL-1 β やTNF- α の過剰生産に基づく疾患として、劇症肝炎 [Muto Y. et al. Lancet II, 72 (1988)]、喘息、特発性肺線維症 [Kelley J. Am. Rev. Respir. Dis., 141(3), 765 (1990)]、ARDS (adult respiratory distress syndrome) [Millar A. et al. Lancet II, 712 (1989)]等の呼吸器系疾患、自己免疫性甲状腺疾患 [江口 勝美ら 最新医学からのアプローチ1 サイトカインから、メジカルビュー社、38 (1991)]、ライム病 [Habicht G.S. et al. J. Immunol., 134, 3147 (1985)]、アルツハイマー病 [Griffin W.S.T. a

et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86, 7611 (1989))、クローン病〔八木田 旭邦 医学のあゆみ, 147, 375 (1988)〕、中毒ショック症候群〔Ikejima T. et al. J.Clin.Invest., 73, 1312 (1984)〕、骨粗しょう症〔Pacifizi R. et al. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 86, 2398 (1989)〕、痛風〔Di Giovine F.S. et al. J.Immunol., 138, 3213 (1987)〕、急性骨髄性白血病〔Sakai K. et al. J.Exp.Med., 166, 1587 (1987)〕、子宮内膜炎〔Romero R., et al. Am.J.Obstet.Gynecol. 160, 1117 (1989)〕などが挙げられる。

スフィンゴミエリナーゼは、生体内の細胞膜系および核内に含まれるコリン含有脂質の一つであるスフィンゴリエリンを基質として、このものをセラミドとホスホリルコリンに分解する酵素である。本酵素は、当初は酸性域に至適 pH を有するリソソームの加水分解酵素の一つとして見いだされたが、最近では中性域に至適 pH を有する同酵素活性がミクロソーム画分、形質膜にも見いだされており〔Allan D. et al. Biochim.Biophys.Acta., 693, 53 (1982)、T-Koizumi K. and Kojima K. J.Biochem., 99, 1803 (1986)、これらの諸酵素が生体内のスフィンゴリエリンの代謝に実際的に関与しているものと考えられる。

上記反応の生成物の一つセラミドは更にセラミダーゼにより加水分解され、脂肪酸とスフィンゴシンを生じる。そして、スフィンゴリエリンが哺乳動物体内で代謝されて、セラミドさらにスフィンゴシンとなることは *in vivo* の実験で確かめられている〔Schneider P.B. and Kennedy E.P. J.Lipid Res., 9, 58 (1968)〕。スフィンゴリエリンの分解産物であるこのセラミドやスフィンゴシンは、細胞の増殖・分化、及び、それらに密接に関連をもつ情報伝達の制御機構に関与していることが示され〔小島清秀と小泉恵子 蛋白質 核酸 酵素, 36, 629 (1991)〕、この反応経路はスフィンゴリエリン経路と呼ばれている。

IL-1 β やTNF- α が標的細胞の受容体に結合し、その後、細胞内にてシグナル伝達が行われるときに、このスフィンゴリエリン経路が関与していることが示されている〔Dressler K.A. et al. Science, 255, 1715 (1992)、Mathias et al. Science, 259, 519 (1993)〕。

従って、スフィンゴミエリナーゼ活性の阻害物質によりこれらTNF- α やIL-1 β のシグナル伝達を遮断することができ、これらサイトカインが関与する病態

を改善することができる。

一方、スフィンゴミエリナーゼの反応物がシクロオキシゲナーゼを活性化し、これを介してPGE₂産生を促進していることが示されている (Ballou L.R. et al. J. Biol. Chem. 267, 20044, (1992))。

また、スフィンゴミエリナーゼ反応そのものが、粥状動脈硬化の発症に関わるLDLや変性LDLの末梢細胞内への取り込みを促進し、コレステロール・エステル合成及びその細胞内蓄積を増加させ [Stein O. et al. Biochim. Biochim. Acta., 1126, 291 (1992)、Chatterjee S. J. Biol. Chem., 268, 3401 (1993)]、本病態の進展に関わることが予想されている。

さらに、スフィンゴミエリナーゼの活性化は腎臓の近位尿細管に於いてジヌソイド側の頂端膜内にあるスフィンゴミエリン含量を減らし、Na依存性に機能するリン酸や糖の取り込みを減少させる [Vrtovsni F. et al. Kidney International., 41, 983 (1992)]。

また、HIVに感染したCEM細胞でセラミドの量が亢進していることが示され [Veldhoven P.P.V. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 209 (1992)]、生体内のHIV感染細胞でスフィンゴミエリナーゼが活性化していることが示されている。

以上の事実から、スフィンゴミエリナーゼに対する特異的な阻害物質は、抗HIV剤、抗糖尿病剤、抗動脈硬化剤、抗骨粗しょう症剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、利尿剤、そして、呼吸器系疾患、甲状腺疾患、アルツハイマー病、肝炎、腎炎、白血病、及びカケクシアに対する予防薬、治療薬として使用できる。

しかしながら、スフィンゴミエリナーゼに対して特異的かつ強力な阻害物質は現在まで見いだされていない。

従来、IL-1 β 作用を特異的に阻害する物質としては、可溶性IL-1レセプターやIL-1レセプターアンタゴニストが見いだされ、これらを用いての敗血症性ショック患者やRA患者での症状改善がみられている。

また、TNF- α 作用を特異的に阻害する可溶性TNF受容体、抗TNF抗体を用いての、エンドトキシンショックや急性GHVDなどを対象とした臨床試験

が実施され、その有効性が観察されている [Vincent J.-L. et al. Chest, 101, 810 (1992)、Herve P. et al. Blood, 79, 3362 (1992)]。

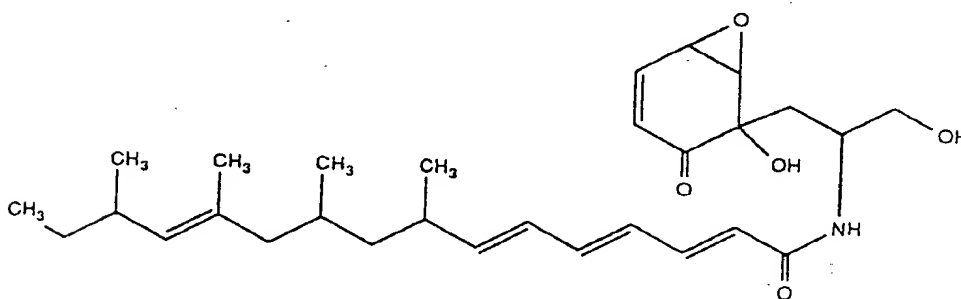
しかし、これらはどれもペプチド性もしくは高分子量の物質であるため、薬剤としての体内への吸収性や血中での安定性等に於いて欠点を有する。かかる観点より、スフィンゴミエリナーゼに対して特異的な阻害活性を有する、低分子生理活性物質が望まれていた。

「発明の開示」

本発明者らは微生物代謝産物中よりスフィンゴミエリナーゼ阻害活性を有する物質を検索し、枯死した草本の茎より分離した *Dasyscyphus* 属に属する *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis 株の培養液中にスフィンゴミエリナーゼ阻害活性を有する新規化合物 F-10463a が生産されることを見出し、本発明を完成した。

本発明の F-10463a は下記の構造式および性状を有する。

構造式



物理化学的性状

- 1) 性質；無色油状物質、
- 2) 溶解性；メタノール、酢酸エチル、クロロホルムなどの有機溶媒に可溶、
水に不溶
- 3) 呈色試験；50% 硫酸、ヨウ素に陽性。
- 4) 分子式； $C_{29}H_{43}NO_5$
- 5) 分子量；485（高分解能FABMS 法により $[M+H]^+$ 486.3199（測定値））
（計算値：486.3204）
- 6) 比旋光度； $[\alpha] +64.44$ (c 0.09 in MeOH)
- 7) 紫外線吸収スペクトル；（メタノール中）300 nm (ϵ 41500)
- 8) 赤外線吸収スペクトル；（クロロホルム中）
3410, 1655, 1608, 1508 cm^{-1}
- 9) 1H -核磁気共鳴スペクトル；（重メタノール中：PPM, TMS 基準）
7.15 (m, 2H), 6.53 (dd, $J=14.9, 10.7$ Hz, 1H), 6.25 (dd, $J=14.9, 11.1$ Hz, 1H),
6.15 (dd, $J=15.1, 10.7$ Hz, 1H), 6.07 (dd, $J=9.8, 1.6$ Hz, 1H),
5.89 (d, $J=14.8$ Hz, 1H), 5.70 (dd, 15.1, 8.7 Hz, 1H),
4.8 (HD0 のシグナルの下に隠れている、1H), 4.05 (m, 1H),
3.67 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 3.52 (dd, $J=10.9, 5.1$ Hz, 1H),
3.45 (dd, $J=10.9, 5.8$ Hz, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.27 (m, 1H),
2.08 (dd, $J=14.7, 3.6$ Hz, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.79 (dd, 13.1, 7.1 Hz, 1H),
1.59 (m, 1H), 1.54 (d, $J=1.3$ Hz, 3H), 1.33 (m, 2H), 1.19 (m, 1H),
~1.1 (m, 1H), 1.00 (d, $J=6.7$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J=6.6$ Hz, 3H),
0.86 (t, $J=7.4$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)
- 10) ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル；（重メタノール中：PPM, 重メタノール基準）
200.1 (s), 169.0 (s), 146.6 (d), 146.4 (d), 142.9 (d), 141.9 (d), 134.7 (d), 134.0 (s)
132.5 (d), 130.4 (d), 129.9 (d), 124.3 (d), 78.0 (s), 66.1 (t), 58.7 (d), 50.1 (t),
49.8 (d), 48.5 (d), 45.7 (t), 40.3 (t), 36.7 (d), 35.9 (d), 32.2 (t), 30.0 (d), 22.4 (q)
22.0 (q), 20.4 (q), 16.9 (q), 13.0 (q)
- 11) 高速液体クロマトグラブグラフィー

保持時間: 5.65 分

カラム: ナカライテスク製コスモシール 5 C18-AR, 4.6 ϕ X150mm

溶媒: 70% アセトニトリル- 水

流速: 1ml/ml

検出: UV 210nm

生産菌

本発明において用いられる *Dasyscyphus* 属に属する菌株としては、例えば *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis SANK13892株 (FERM BP-4491) を挙げることができ、この菌株の菌学的性状は次のとおりである。

SANK13892 は、1991年5月、青森県において採集された枯死した草本の茎から分離したものである。

子囊盤は直径最大で0.2mmの無柄の平坦な円盤状で、灰橙色～黄色を呈する。子囊盤の周縁に毛を有し、縁は盛り上がらない。托外皮層は多角菌組織様を呈し、淡褐色で薄膜の細胞よりなる。托髓層は密に絡み合って外壁とやや平行な菌糸よりなり、絡み合い菌組織を呈する。毛は托外皮層の最外層の細胞より生じて真直ぐに伸長し、円筒形であり、薄膜、多数の隔壁を有し、最大長200 μ m、太さ3.5 μ mである。その先端はほとんど鈍頭である。表面はほとんど平滑で、樹脂状の不定形物質が散在・付着する。子囊はクランプより生じ、円筒形、8孢子性で、大きさ58-66 x 5-6.5 μ mである。その先端はメルツァー試薬にて青変する。側糸は細い槍型であり、大きさ74.5-100 x 3.5-4 μ m、子囊より約20 μ m上に伸長する。子囊胞子は桿形から紡錘形、単細胞、無色であり、大きさ18-26.5 x 2.5-5 μ mである。

PDA上の生育は、23℃、10日で1.5 cmに達する。表面は淡橙色～澄白色を呈し、コロニー中央部にやや盛り上がる。気菌糸の発達はあまり旺盛でなく、絡み合って菌糸束を形成する。表面は粉状となる。裏面は、淡橙色～澄白色を呈する。さらに培養を継続することによって、より濃色となる。分生子は観察されない。

以上のような菌学的特徴から、本菌に該当するものを検索したところ、Utani (1967) Notes on some cup fungi of the Hyaloscyphaceae collected in Hokkai

do, Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan 8:33-42.に記載されている *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis (ダシスキファス・モリシムス・ラッシュ・デニス) に一致した。よって本菌を *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis と同定し、*Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis SANK13892 と命名した。本菌は、1993年12月10日に日本国通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託され、寄託番号 FERM BP-4491 が付された。

培養法及び精製法

本発明の新菌株を分離するに際し使用される分離培地としては炭素源、窒素源、無機イオンおよび有機栄養源等より選択されたものを適宜含有する培地であれば合成または天然培地の何れでも使用可能である。F-10463aは SANK13892 株を適当な培地で培養し、それから採取することによって得られる。栄養源としては、従来、真菌類の培養に利用されている公知のものが使用できる。例えば、炭素源としてはグルコース、シュクロース、澱粉、グリセリン、水飴、糖蜜、大豆油などが使用できる。また、窒素源としては大豆粉、コーンスチープリカー、イーストエキス、麦芽エキス、ジャガイモ、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム等を使用する。このほか必要に応じて炭酸カルシウム、リン酸塩等の無機塩類を添加するほか、菌株の発育を助け、F-10463aの生産を促進するような有機および無機物を適当に添加することができる。培養法としては、一般の抗生物質を生産する方法と同じく液体培養法、特に深部培養法が最も適している。培養は、好氣的条件下で行われ、培養に適当な温度は15-30℃であるが、多くの場合23℃付近で培養する。F-10463aの生産は、振盪培養で通常5-8日で最高値に達する。

培養終了後、培養液中の菌体あるいは口液に存在するF-10463aを培養液の容量程度のアセトン、アセトニトリルのような有機溶媒を添加し混合することにより抽出する。抽出物中に存在する固形部分を珪藻土をろ過操作助剤とするろ過操作または遠心分離によって分別し、そのろ液または上清中に存在するF-10463aを、スフィンゴミエリナーゼ阻害活性を指標にして、その物理化学的性状を利用し抽出精製する。例えば、この抽出液中に存在するF-10463aは、まず濃縮操作で混在する有機溶媒を除去した後に、氷と混和しない有機溶剤、例えばn-ブタノール

、メチルエチルケトン、酢酸エチル、クロロホルム、塩化エチレン、塩化メチレンなどの単独または、それらの組み合わせにより抽出精製することができる。あるいは吸着剤として、例えば活性炭または吸着用樹脂であるアンバーライト XAD-2、XAD-4（ローム・アンド・ハース社製）等や、ダイヤイオン HP-10、HP-20、CHP-20P、HP-50（三菱化成（株）製）等を使用する事ができる。F-10463aを含む液を上記のごとき吸着剤の層を通過させて不純物を吸着させて取り除くか、またはF-10463aを吸着させた後、メタノール水、アセトン水、n-ブタノール水などを用いて溶出させることにより得られる。このようにして得られたF-10463aは、更にシリカゲル、フロリジルのような担体を用いた吸着カラムクロマトグラフィー、セファデックス LH-20（ファルマシア社製）などを用いた分配カラムクロマトグラフィー、セファデックス G-25（ファルマシア製）などを用いたゲルろ過クロマトグラフィー、および順相、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等で精製することが出来る。

スフィンゴミエリナーゼ阻害活性は以下の方法で測定できる（J. Lipid Res. 20, 456 (1979)）。

即ち、先ず、基質溶液として $10\mu\text{l}$ の [N-メチル- ^{14}C] スフィンゴミエリン（牛、 $52\text{mCi}/\text{mmol}$ 、 $25\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ；アマシャム社）と $200\mu\text{l}$ のスフィンゴミエリン（牛、 20mM 、シグマ社）を窒素ガスで乾固させた後、 $200\mu\text{l}$ の 1M トリス-塩酸（ $\text{pH} 7.5$ ）、 $40\mu\text{l}$ の 10% （ v/v ）トリトン X-100、 $20\mu\text{l}$ の 0.5M MgCl_2 、及び 1.24ml の H_2O を加えて 48°C 、 30 分のインキュベーションを行い、プローブ型超音波破碎装置で、 20W の出力条件下、 15 秒、 2 回の超音波処理を施し、 ^{14}C スフィンゴミエリンを含む混合ミセル系を作成した。

スフィンゴミエリナーゼ反応は、この様にして用意した基質溶液 $150\mu\text{l}$ に検体溶液 $10\mu\text{l}$ を混合し、ウイスターイマミチ系雄性ラット脳のミクロソーム画分（ $25, 000\times g \sim 100, 000\times g$ 、蛋白質濃度 $3\sim 4\text{mg}/\text{ml}$ ） $40\mu\text{l}$ を酵素溶液として加えて 37°C 、 40 分インキュベーションすることにより行った。反応終了後、クロロホルム：メタノール（ $2:1$ 、 v/v ）を $500\mu\text{l}$ 加えて抽出操作を施し、得られた水層 $150\mu\text{l}$ を 3ml のピコフロー™

40 (バカードジャパン株式会社) と混合して反応物である [^{14}C] ホスホリルコリン量を液体シンチレーションカウンターで測定した。スフィンゴミエリナーゼ活性は、この測定値からスフィンゴミエリナーゼ反応に必要な MgCl_2 を除いた場合での測定値を差し引いた値として計算される。

「発明を実施するための最良の形態」

次に実施例をあげて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

実施例 1. F-10463a 物質の精製

(1) 培養

Dasyscyphus mollissimus (Lasch) Dennis SANKI3892 株を無菌的に、滅菌した後述の組成の培養培地 100 ml を含む 500 ml の三角フラスコ (種フラスコ) に接種した。次いでこれを 5 日間、200 rpm のロータリー振とう機で前培養を行った。

表 - 1

培地組成

グリセロール	50g
ジャガイモ	50g
イースト・イクストラクト	5g
マルト・イクストラクト	5g
消泡剤 (CB-442)	0.2g
<hr/>	
イオン交換水	1000ml
pH 無調整	

本培養は以下のように行った。滅菌した上述の組成の培養培地 100 ml を含む 500 ml の三角フラスコ 15 本に種培養液をそれぞれ 5 ml 入れ、23℃で7日間、200rpm のロータリー振とう機で培養を行った。

(2) スフィンゴミエリナーゼ阻害活性の測定法

スフィンゴミエリナーゼの酵素標品の調製は、基本的には Gatt S. (Biochem. biophys. Res. Commun. 68, 235 (1976)) の方法に従って行った。すなわち、スフィンゴミエリナーゼの酵素源としてラット脳を用い、先ず、以下の様にそのミクロソーム画分を調製した。10匹のウイスターイマミチ系雄性ラット(9週齢)を頸動脈放血後、全脳を摘出した。迅速に、小脳を除去後、予め4℃に冷却したバッファーA(0.25M 蔗糖、1mM EDTA、1mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)、0.1mM ロイペプチン、5mM トリシュー塩酸緩衝液、pH 7.4) 130mlを加え、4℃条件下、ポッターのホモジナイザーを用いて脳細胞の破碎を行った。次に、得られた細胞破碎液を4℃条件下、700×g、10分間の遠心分離を行い、その上清を更に、4℃条件下、25,000×gで10分間の遠心分離を行った。最後に、得られた上清を4℃条件下、100,000×gで60分間の超遠心分離を行い、その沈澱物をミクロソーム画分とした。尚、この画分はスフィンゴミエリナーゼの活性測定時まで液体窒素下で凍結保存し、使用時にバッファーAで蛋白質濃度3~4mg/ml程度になる様に調製した。

スフィンゴミエリナーゼ活性は混合ミセル系を使って、Hostetler K.Y. と Yazaki P.J. の方法(J. Lipid Res. 20, 456 (1979))を参考にして、以下の様に測定した。即ち、先ず、混合した10μlの[N-メチル-¹⁴C]スフィンゴミエリン(牛、52mCi/mmol、25μCi/ml;アマシャム社)と200μlのスフィンゴミエリン(牛、20mM、シグマ社)を窒素ガスで乾固させた後、200μlの1Mトリシュー塩酸(pH 7.5)、40μlの10%(v/v)トリトンX-100、20μlの0.5M MgCl₂、及び1.24mlのH₂Oを加えて48℃、30分のインキュベーションを行った。そして、プローブ型超音波破碎装置で、20Wの出力条件下、15秒、2回の超音波処理を施し、[

¹⁴C] スフィンゴミエリンを含む混合ミセル系を作成した。

スフィンゴミエリナーゼ反応は、この様にして用意した基質溶液 15.0 μ l に検体溶液 10 μ l を混合し、先に供述した酵素溶液 40 μ l を加えて 37℃、40 分インキュベーションすることにより行った。反応終了後、クロロホルム：メタノール（2：1、v/v）を 500 μ l 加えて抽出操作を施し、得られた水層 150 μ l を 3ml のピコフローTM40（パッカードジャパン株式会社）と混合して反応物である [¹⁴C] ホスホリルコリン量を液体シンチレーションカウンターで測定した。スフィンゴミエリナーゼ活性は、この測定値からスフィンゴミエリナーゼ反応に必要な MgCl₂ を除いた場合での測定値を差し引いた値として計算される。

この方法で測定した、スフィンゴミエリナーゼ反応を 50% 阻害するのに必要な F-10463a の濃度は 20 μ g/ml であった。

(3) 単離

三角フラスコ 15 本分の培養液を 6N 塩酸で pH 3 に調整し、続いて 3000 回転、10 分、遠心分離を行った。得られた菌体に 80% アセトンを 500 ml 加え、1 時間攪拌した。この混合物を 3000 回転、10 分、遠心分離を行い、上清を減圧濃縮してアセトン除去した。次にこれを等量の酢酸エチルで 2 回抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して褐色の油状物を 430 mg 得た。このうち 400mg を少量の塩化メチレン：メタノール、100:1 の溶媒に溶解し、同じ溶媒で平衡化した 80ml のシリカゲルカラムにチャージした。このカラムを 240ml の塩化メチレン：メタノール、100:1 の溶媒で溶出し、さらに 240 ml の 50:1、20:1 及び 10:1 の溶媒で溶出し、それぞれの溶出液を分画した。酵素阻害活性は 20:1 の分画に認められたのでこの分画を濃縮し、78mg の褐色の油状物質を得た。これを少量のメタノールに溶解し、以下のように調製用 HPLC で精製した。すなわち、約 20mg ずつ、70% アセトニトリル水溶液で平衡化した HPLC カラム（ナカライテスク製コスモシル 5C18-AR, 20 ϕ X 250mm）にチャージし、同じ溶媒で 10ml/min. の流速で展開した。210 nm の吸収を検出し、約 30 分にでるピークを分取した。分取した溶液

を減圧濃縮し、22mg の F-10463a 物質を得た。

「産業上の利用可能性」

本発明の新規化合物 F-10463a は、抗HIV剤、抗糖尿病剤、抗動脈硬化剤、抗骨粗しょう症剤、抗血栓剤、抗炎症剤、免疫抑制剤、利尿剤、そして、呼吸器系疾患、甲状腺疾患、アルツハイマー病、肝炎、腎炎、白血病、及びカケクシアに対する予防薬、治療薬として使用できる。

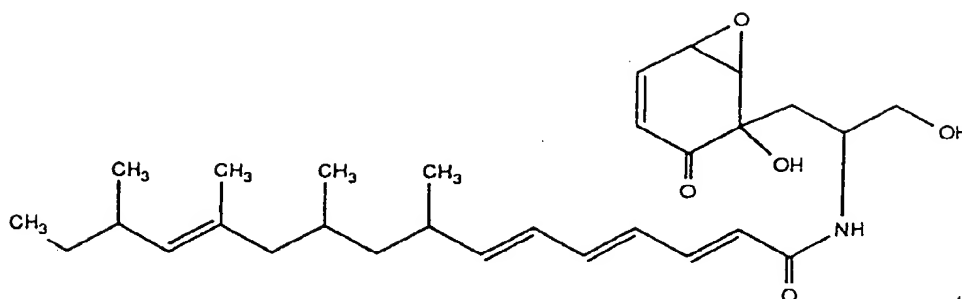
上記の症状を処置するために用いる本発明の組成物は、医学的に挙用される担体と治療上有効な量の F-10463a との混合物から成る。本組成物は、種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤による経口投与、または、注射剤、点滴剤、坐薬などによる非経口投与を挙げることができる。

注射剤又は点滴剤として投与される場合、本発明の治療組成物は発熱物質を含まず、非経口的に許容可能な水溶液の態様である。pH、等張性及び安定性を考慮して調製される上記の非経口的に許容され得る調剤は当業者の技術的範囲内にある。

上記症状の処置における投与量及び投与法は、本薬剤の作用に影響を及ぼし得る要因、例えば、患者の症状、体重、性、年齢、食事、何らかの感染の重度、投与の時間及びその他の臨床上影響を与える要因を考慮して診察する医師によって決定され得る。通常、経口投与では成人に対して1日約 0.01 mg 乃至 1000 mg であり、これらを1回又は数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回約 0.01 mg 乃至 100 mg を皮下注射、筋肉注射、又は静脈注射によって投与することができる。

請 求 の 範 囲

1. 以下の一般式で示される新規化合物 F-10463a。



2. *Dasyscyphus* 属に属する F-10463a 生産菌を培養し、その培養物より F-10463a を採取することを特徴とする F-10463a の製造法。
3. *Dasyscyphus* 属に属する F-10463a 生産菌が、*Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis SANK 13892 株 (FERM BP-4491) である、クレーム 2 に記載の製造法。
4. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、薬学的組成物。
5. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗 HIV 剤。
6. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗糖尿病剤。
7. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗動脈硬化剤。
8. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗骨粗しょう症剤。
9. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗血栓剤。
10. クレーム 1 に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗炎症剤。

11. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、免疫抑制剤。

12. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、利尿剤。

13. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗呼吸器系疾患剤。

14. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗甲状腺疾患剤。

15. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗アルツハイマー病剤。

16. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗肝炎剤。

17. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗腎炎剤。

18. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗白血病剤。

19. クレーム1に規定される化合物の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、抗カケクシア剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C07D303/36, C12P17/02, A61K31/335

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C07D303/36, C12P17/02, A61K31/335

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 3-157386 (Merck & Co., Inc.), July 5, 1991 (05. 07. 91) & EP, A1, 411703 & US, A, 5064856	1 - 19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
March 17, 1995 (17. 03. 95)

Date of mailing of the international search report
April 18, 1995 (18. 04. 95)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07D303/36, C12P17/02, A61K31/335

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ C07D303/36, C12P17/02, A61K31/335

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 3-157386 (メルク エンド カムパニー イン コーポレーテッド), 5. 7月, 1991 (05. 07. 91) & EP, A1, 411703 & US, A, 5064856	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 03. 95

国際調査報告の発送日

18. 04. 95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷口 博

4 B 7 4 3 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



TRANSLATION

International Patent Publication

(11) International Patent Publication No.: WO95/18119

(43) International Patent Publication Date: July 6, 1995

(51) International Classification⁶:

C 07 D 303/36, C 12 P 17/02, A 61 K 31/335

(21) International Patent Application No.: PCT/JP94/02202

(22) International Patent Filing Date: December 26, 1994

(30) Priority Information:

Japanese patent application No.: Hei 5-330613

Japanese patent filing date: December 27, 1993 JP

(71) Applicant (destination countries other than US)

Sankyo Company, Ltd. [JP/JP]

5-1, 3-chome Honcho, Nipponbashi, Chuo-ku

Tokyo-to, Japan 103 (JP)

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicant (US only)

Takoshi Ogita [JP/JP]

Futoshi Nara [JP/JP]

Kazuhiko Tanzawa [JP/JP]

c/o Sankyo Company, Ltd.

2-58, 1-chome Hirocho, Shinagawa-ku

Tokyo-to, Japan 140 (JP)

Tsuyoshi Hosoya [JP/JP]

Kouhei Furuya [JP/JP]

c/o Sankyo Company, Ltd.

33 Gokogaoka, Tsukuba-shi

Ibaraki-ken, Japan 305 (JP)

(74) Agent

Minoru Nakamura, et al., patent agent

Room 646, Shintokyo Building

3-1, 3-chome Marunouchi

Chiyoda-ku, Tokyo-to, Japan 100 (JP)

(81) Destination Countries:

AU, CA, CN, CZ, FI, HU, KR, NO, NZ, RU, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

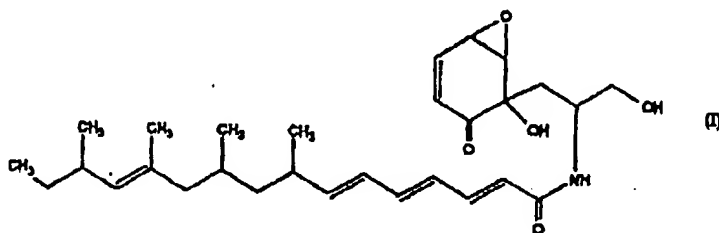
Attached document: International search report

(54) Title of the invention:

Novel compound F-10463a

(57) Abstract

A novel compound F-10463a represented by formula (I). It is useful as an anti-HIV drug, antidiabetic, antiartherosclerotic, antihypertensive, antithrombotic, anti-inflammatory, immunosuppressant, diuretic, and a preventive or remedy for respiratory disease, thyroid disease, Alzheimer's disease, hepatitis, nephritis, leukemia, and cachexia.



FOR INFORMATION

Codes for the identification of PCT contracting states on the title page of the Description, countries which publish international applications according to the PCT.

AM	Armenia	ML	Mali
AT	Austria	MN	Mongolia
AU	Australia	MR	Mauritania
BB	Barbados	MW	Malawi
BE	Belgium	MX	Mexico
BF	Burkina Faso	NE	Niger
BG	Bulgaria	NL	The Netherlands
BJ	Benin	NO	Norway
BR	Brazil	NZ	New Zealand
BY	Belarus	PL	Poland
CA	Canada	PT	Portugal
CF	Central African Republic	RO	Romania
CG	Congo	RU	Russian Federation
CH	Switzerland	SD	Sudan
CI	Ivory Coast	SE	Sweden
CM	Cameroon	SG	Singapore
CN	China	SI	Slovenia
CZ	Czech Republic	SK	Slovakia
DE	Germany	SN	Senegal
DK	Denmark	SZ	Swaziland
EE	Estonia	TD	Chad
ES	Spain	TG	Togo
FI	Finland	TJ	Tajikistan
FR	France	TM	Turkmenistan
GA	Gabon	TT	Trinidad-Tobago
GB	United Kingdom	UA	Ukraine
GE	Georgia	UG	Uganda
GN	Guinea	US	United States of America
GR	Greece	UZ	Uzbekistan
HU	Hungary	VN	Vietnam
IE	Ireland		
IS	Iceland		
IT	Italy		
JP	Japan		
KE	Kenya		
KG	Kyrgyzstan		
KP	Peoples' Democratic Republic of Korea		
KR	Republic of Korea		
KZ	Kazakhstan		
LI	Liechtenstein		
LK	Sri Lanka		
LR	Liberia		
LT	Lithuania		
LU	Luxembourg		
LV	Latvia		
MC	Monaco		
MD	Republic of Moldova		
MG	Madagascar		

SPECIFICATION

Novel compound F-10463a

Industrial field of utilization

This invention is related to a novel compound, F-10463a, which is an inhibitor of sphingomyelinase and useful as a drug for various diseases, and to its preparation method.

Prior art

Interleukin-1 β (abbreviated below as IL-1 β) has multiple biological functions and is commonly considered as a substance essential for maintaining the normal biological activity of human body. However, when abnormality occurs in the production or balance of IL-1 β , excess IL-1 β can be produced, resulting in various diseases. Moreover, tumor necrosis factor- α (abbreviated below as TNF- α) is known to have the functions of killing certain tumor cells and virus-infected cells and increasing the antibacterial effect of granulocytes. However, excess production of TNF- α is the major reason for several diseases.

The two cytokines are produced from completely different genes and have their own receptors. Their structures are also different. However, there are many redundancies in their biological activities and target cells. For example, both cytokines are the major causes of septic shock due to endotoxins (LPS) [Tracy K. J., et al., *Sciences*, **234**, 470 (1986), Tracy K. J., et al., *Nature (London)*, **330**, 662 (1987)]. They are also related to various infections caused by adventitious microorganisms, parasites, viruses, etc., such as granuloma [Kobayashi K., et al., *J. Immunol.*, **134**, 358 (1995)], meningococcal meningitis and malarial infection [Curfs, J. H. A., et al., *J. Exp. Med.*, **172**, 1287 (1990)], etc. The two types of cytokines play an active role in many important steps of these acute infectious diseases, including local infiltration into the infected cells [Gamble J. R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 8667 (1985)], Miyasaka M., et al., *Menyeki (Immune)*, 91, 57, Chuga Igakusha (1991)], fever [Dinareello G. A., *Lymphokines*, **14**, 1 (1987)], acute induction of proteins [Perimutter D. H., et al., *J. Clin. Invest.*, **78**, 1349 (1986)], and promoting the production of prostanoid, particularly PGE₂ (Dayer J. -M., et al., *J. Exp. Med.*, **162**, 2163 (1985), Turinsky J., et al., *Am. J. Physiol.*, **262**, E476 (1992), Ballou L. R., et al., *J. Biol. Chem.*, **267**, 20044 (1992)].

Moreover, IL-1 β and TNF- α are involved in the development and progression of many chronic diseases. In the case of chronic rheumatoid arthritis (RA), for example, the two cytokines activate infiltration of lymphocytes into the synovial membrane tissue and promote the growth of synovial membrane cells as well as bone resorption [Mizel S. B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 2474 (1980), Miyasaka N., et al., *Arthritis Rheum.*, **31**, 480 (1988), Arend W. P. and Dayer J.-M., *Arthritis Rheumatism*, **33**, 305 (1990)]. The two cytokines are also involved in collagenosis, another rheumatoid disease, [Tanaka Y., et al., *J. Immunol.*, **143**, 1584 (1989)], Kawasaki disease, consisting of mainly systemic angitis [Leung D. Y. M., et al., *J. Exp. Med.*, **164**, 1958 (1986)], granuloma as well as other fibrosis-related chronic diseases [Le J. and Vilcek J., *Lab. Invest.*, **56**, 234 (1987)]. In fact, a part of the effect achieved by using glucocorticoids in the treatment of chronic inflammatory diseases has been considered due to the function of suppressing the production of cytokines [Lew W., et al., *J. Immunol.*, **140**, 1895 (1988)]. However, glucocorticoids can cause a series of severe side effects due to their complicated biological functions.

It has been reported that IL-1 β and TNF- α are also involved in many other biological activities, such as adhesion of monocytes to blood vessel endothelial cells and subendothelial wandering of monocytes [Pober J. S., et al., *J. Immunol.*, **137**, 1893 (1986), Nelken N. A., et al., *J. Clin. Invest.*, **88**, 1121 (1991)], promoting abnormal growth of blood vessel smooth muscle cells [Raines E. W., et al., *Sciences*, **243**, 393 (1989)], development and progression of atherosclerosis.

The two cytokines, IL-1 β and TNF- α , are able to promote the production of the platelet activation factor (PAF), introduce tissue factor to the membrane surface of endothelial cells, reduce thrombomodulin protein C, and suppress the production of plasminogen activator β -inhibitor 1, resulting in thrombosis through platelet aggregation and blood coagulation [Bevilacqua M. P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 4533 (1986), Le J. and Vilcek J., *Lab. Invest.*, **56**, 234 (1987), Sato H., *Kendai Igaku (Modern Medicine)*, **23**, 3163 (1991)].

For insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), there is a latent and chronic autoimmune process occurring in the pancreatic islets, especially in pancreatic β cells, before the disease is developed completely. It is known that IL-1 β and TNF- α are involved in the process [Nerup J., et al., *Diabetes Care.*, **11**, 16 (1988)]. On the other hand, in the case of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), TNF- α is also involved in insulin resistance

through its action on muscle and liver cells after having been generated in fat cells [Spiegelman B. M., et al., *J. Biol. Chem.*, **268**, 6823 (1993)].

Moreover, IL-1 β and TNF- α are known to be deeply involved in the proliferation of mesangial cells and growth of matrix, which are the main problems for glomerular nephritis [Werber H. I., et al., *J. Immunol.*, **138**, 3207 (1987), Band L., et al., *Kidney Int.*, **41**, 600 (1992)].

In addition, IL-1 β and TNF- α are capable of promoting the production of IL-2 from T-cells as well as the expression of the corresponding receptors and activating the immune functions of other immune cells [Gillis S. and Mizel S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 1133 (1981), Scheurich P., et al., *J. Immunol.*, **138**, 1786 (1987)]. Due to this effect, the cytokines may cause graft versus host disease (GVHD) in organ-transplanted patients.

It is also known that TNF- α causes anorexia in the patients with chronic infection or in cancer patients through suppression of the activity of lipoprotein lipase in fat cells, resulting in extreme body weight loss (cachexia). Therefore, TNF- α is also known as cachectin [Beutler D., et al., *Nature (London)*, **316**, 552 (1985)].

In cells infected with HIV (human immunodeficiency virus), TNF- α is able to activate the transcription from HIV viral genome terminal :LTR: inserted in the host chromosome through transcription factor NF- κ B, promoting the growth of HIV [Nabel G., et al., *Nature*, **326**, 711 (1987), Schreck R., et al., *EMBO Journal*, **10**, 2247 (1991)].

Furthermore, many diseases are mainly due to excess production of IL-1 β and TNF- α , such as fulminating hepatitis [Muto Y., et al., *Lancet*, **11**, 72 (1988)], asthma, idiopathic pulmonary fibrosis [Kelley J., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**(3), 765 (1990)], ARDS (adult, respiratory distress syndrome) [Millar A., et al., *Lancet*, **11**, 712 (1989)], autoimmune thyropathy [Eguchi K., et al., *New Medical Approach I, From Cytokines*, Medical View Co., 38 (1991)], Lyme disease [Habicht G. S., et al., *J. Immunol.*, **134**, 3147 (1985)], Alzheimer's disease [Griffin W. S. T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 7611 (1989)], Crohn's disease [Yagita A., *Igaku no Aumi (New Development in Medicine)*, **147**, 375 (1988)], toxic shock syndrome [Ikejima T., et al., *J. Clin. Invest.*, **73**, 1312 (1984)], osteoporosis [Pacifci R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2398 (1989)], gout [Di Giovine F. S., et al., *J. Immunol.*, **138**, 3213

(1987)], acute myeloid leukemia [Sakai K., et al., *J. Exp. Med.*, **166**, 1587 (1987)], endometritis [Romero R., et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **160**, 1117 (1989)].

Sphingomyelinase is an enzyme capable of decomposing sphingomyelin, a choline-containing lipid present in the cell membrane and nucleus as substrate, into ceramide and phosphorylcholine. The enzyme was initially discovered as one of the lysosome hydrolases with an optimum pH value in the acidic range. Recently, similar enzyme activities with an optimum pH value in the neutral range were also found in the microsome fraction and membrane part [Allan D. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **693**, 53 (1982), T-Koizumi K. and Kojima K., *J. Biochem.*, **99**, 1803 (1986)]. These enzymes are considered to be involved in the *in vivo* metabolism of sphingomyelin.

One of the hydrolysis products, ceramide, is further hydrolyzed by ceramidase to form fatty acid and sphingosine. The metabolism of sphingomyelin into ceramide and further sphingosine in mammals has been confirmed by the *in vivo* experiment [Schneider P. B. and Kennedy E. P., *J. Lipid Res.*, **9**, 58 (1968)]. It has been shown that ceramide and sphingosine, the metabolic products generated from sphingomyelin, are involved in the growth and proliferation of cells as well as the control mechanism of closely related information transmission [Kojima K. and Koizumi K., *Tanpakushitsu, Kakusan, Koso (Protein, Nucleic Acid, and Enzyme)*, **36**, 629 (1991)]. The reaction pathway is known as the sphingomyelin pathway.

When IL-1 β and TNF- α bind to the corresponding receptors on the target cells, the sphingomyelin pathway is involved in the transmission of signals into the cells [Dressler K. A., et al., *Science*, **255**, 1715 (1992), Mathias et al., *Science*, **259**, 519 (1993)].

Therefore, when the transmission of signals introduced by IL-1 β and TNF- α is blocked by inhibiting the activity of sphingomyelinase using an inhibitor, the symptoms of various diseases related to cytokines can be improved.

On the other hand, it was reported that the products formed in the presence of sphingomyelinase are able to activate cyclooxygenase and promote the production of PGE₂ [Ballou L. R., et al., *J. Biol. Chem.*, **267**, 20044 (1992)].

It was also reported that the sphingomyelinase reaction itself may be involved in the development and progression of atherosclerosis by promoting the uptake of LDL and denatured LDL into the peripheral cells and increasing the synthesis and accumulation of cholesterol in the cells [Stein O., et al., *Biochim. Biochim. Acta.*, **1126**, 291 (1992), Chatterjee S., *J. Biol. Chem.*, **268**, 3401 (1993)].

Moreover, the activation of sphingomyelinase may reduce the concentration of sphingomyelin in the terminal membrane of the proximal convoluted tubules of the kidneys, decreasing the Na-dependent uptake of phosphoric acid and sugar [Vrtovsni F., et al., *Kidney International*, **41**, 983 (1992)].

A high level of ceramide has been observed in the HIV-infected CEM cells, suggesting that sphingomyelinase is activated in the HIV-infected cells [Veldhoven P. P. V., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **187**, 209 (1992)].

Based on the facts described above, it can be reasonably considered that a specific inhibitor of sphingomyelinase may be useful as an anti-HIV agent, antidiabetic agent, anti-arteriosclerotic agent, anti-osteoporotic agent, antithrombotic agent, anti-inflammatory agent, immunosuppressant, diuretic agent, or as a drug for the prevention or treatment of various other diseases, such as respiratory disease, thyroid disease, Alzheimer's disease, hepatitis, nephritis, leukemia, and cachexia.

To date, however, a potent inhibitor specific to sphingomyelinase has not been found yet.

Currently, only soluble IL-1 receptor and IL-1 receptor antagonist are known as specific inhibitor to IL-1 β and have been used to improve the symptoms in septic shock patients and RA patients.

A soluble TNF receptor and anti-TNF antibody specific to TNF- α are currently being tested in human clinical studies for endotoxin shock and acute GHVD. Efficacy has been observed [Vincent J.-I., et al., *Chest.*, **101**, 810 (1992), Herve P., et al., *Blood*, **79**, 3362 (1992)].

However, these compounds are all high molecular weight peptides. As a drug, they have several shortcomings, such as low absorption by the human body and poor stability in the

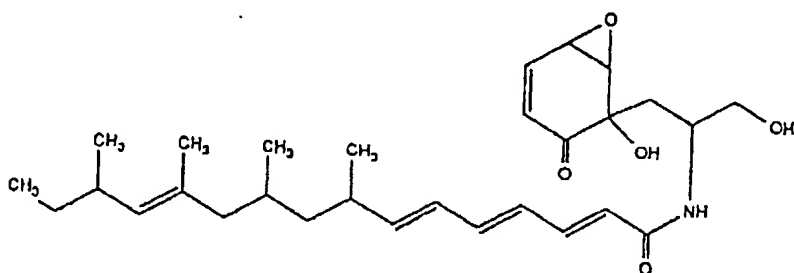
plasma. Therefore, it is highly desirable to find a low molecular weight and biologically active compound capable of inhibiting sphingomyelinase specifically.

Constitution of the invention

The inventors carried out an extensive search for biologically active compounds capable of inhibiting sphingomyelinase specifically from microorganism metabolites. As a result, it was found that a novel compound, F-10463a, produced in the culture medium of *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis, which belongs to *Dasyscyphus* isolated from withered grass stems, has an inhibitory activity against sphingomyelinase. This invention has been completed based on the above discovery.

The novel compound of this invention, F-10463a, has the following structure and properties.

Structure



Physical and chemical properties

- 1) Appearance: Colorless oily substance
- 2) Solubility: Soluble in organic solvents, including methanol, ethyl acetate, chloroform, etc., insoluble in water
- 3) Coloring test: Positive to 50% sulfuric acid and iodine.
- 4) Molecular formula: $C_{20}H_{43}NO_5$
- 5) Molecular weight: 485, high resolution FABMS: $[M+H]^+$ 486.3199 (experimental value) and 486.3204 (calculated value)
- 6) Specific optical rotation: $[\alpha] +64.44$ (c 0.09 in MeOH)
- 7) UV absorption spectrum: 300 nm, $\epsilon = 41500$ in methanol
- 8) IR absorption spectrum: 3410, 1655, 1608, 1508 cm^{-1} in chloroform
- 9) 1H NMR spectrum (in CD_3OD , ppm, TMS internal standard): 7.15 (m, 2H), 6.53 (dd, J = 14.9, 10.7 Hz, 1H), 6.25 (dd, J = 14.9, 11 Hz, 1H), 6.15 (dd, J = 15.1, 10.7 Hz, 1H), 6.07

- (dd, $J = 9.8, 1.6$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 5.70 (dd, $J = 15.1, 8.7$ Hz, 1H), 4.8 (under the HDO signal, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.67 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 3.52 (dd, $J = 10.9, 5.1$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 10.9, 5.8$ Hz, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 2.08 (dd, $J = 14.7, 3.6$ Hz, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.79 (dd, $J = 13.1, 7.1$ Hz, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.54 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H), 1.33 (m, 2H), 1.19 (m, 1H), ~1.1 (m, 1H), 1.00 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H)
- 10) ^{13}C NMR spectrum (in CD_3OD , ppm, CD_3OD internal standard): 200.1(s), 169.0(s), 146.6(d), 146.4(d), 142.9(d), 141.9(d), 134.7(d), 134.0(s), 132.5(d), 130.4(d), 129.9(d), 124.3(d), 78.0(s), 66.1(t), 58.7(d), 50.1(t), 49.8(d), 48.5(d), 45.7(t), 40.3(t), 36.7(d), 35.9(d), 32.2(t), 30.0(d), 22.4(q), 22.0(q), 20.4(q), 16.9(q), 13.0(q)
- 11) High-performance liquid chromatography:
 Retention time: 5.65 minutes
 Column: Cosmosil 5 C18-AR 4.6 \varnothing x 150 mm (Nakalitesk Co.)
 Solvent: 70% acetonitrile-water
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: UV at 210 nm

Fungus strain

The fungus strain used in this invention belongs to *Dasyscyphus*, for example *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis, strain SANK13892 (FERM BP-4491). The detail mycological description of the fungus strain is as follows.

First, SANK13892 was isolated from withered grass stem collected in Aomori province, in May, 1999.

The ascus disk is a flat sessile disk with a maximum diameter of 0.2 mm and has a gray-orange to yellow color. The ascus disk carries hair but no protrusion on the edge. The integumental part shows a polyhedral fungous tissue consisting of light-brown thin-membrane cells. The medullary layer is covered by a fine outer shell and parallel hyphae, showing a cross-linked fungous tissue. The hair extends straightly from the outer layer of integumental part and has a cylinder shape covered by a thin membrane with multiple dissepiments. The maximum length is about 200 μm and the maximum diameter is about 3.5 μm . The end is almost dull. The surface is smooth and carries resin-like amorphous materials scattered on the surface. The ascus is formed from clamp [phonetic], shows a cylinder shape with octospore and has a size of 58 –

66 x 5 – 6.5 μm . The terminal end shows a blue color with the Meltzer's agent. The side hyphae have a fine arrow shape with a size of 74.5 – 100 x 3.5 – 4 μm , growing about 20 μm above the ascus. The ascospore has a shape varying from a bar to a spindle, single cell and colorless, with a size of 18 – 26.5 x 2.5 – 5 μm .

The colony was able to reach 1.5 cm at 23°C in 10 days on PDA. The surface showed a light orange to orange-white color. The central part of the colony protruded slightly. Development of the hyphae was not very rapid, but formation of cross-linked hyphal strand was observed. The surface was powdery, showing a light orange to orange-white color. When the cultivation was continued, the color darkened and no conidiospore was observed.

Based on the mycological features described above, an identification was carried out. As a result, it was found that the strain is identical with *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis reported by Otani in Notes on some cup fungi of the Hyaloscyphaceae collected in Hokkaido, Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 8:33 – 42 (1967). Therefore, the strain was identified as *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis and was named as *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis SANK13892. The strain was deposited to Institute of Life Science and Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japan, at December 10, 1993, Deposition No. FERM BP-4491.

Method of cultivation and purification

The culture medium used in the separation of the new fungus strain of this invention can be either a natural or compounded culture medium containing suitable components, such as carbon source, nitrogen source, inorganic ions, organic nutrients, etc. Compound F-10463a can be obtained by culturing strain SANK13892. The nutrition source can be any nutrition source commonly used in the cultivation of fungi. The carbon source can be, for example, glucose, sucrose, starch, glycerol, millet jelly, honey, soybean oil, etc. The nitrogen source can be, for example, soybean powder, cornsteep liquor, yeast extract, malt extract, potato, ammonium sulfate, sodium nitrate, etc. If necessary, inorganic salts, such as calcium carbonate, sodium phosphate, etc., can be added to support the growth of the fungus. In order to increase the production of F-10463a, common organic and inorganic substances can also be added. In this invention, any common liquid cultivation process for the production of antibiotics, especially deep liquid cultivation process, can be used. The cultivation is carried out under aerobic

conditions at a temperature of 15 – 30°C, preferably 23°C. The maximum production of F-10463a is usually achieved by shaking the culture medium for 5 – 8 days.

When the cultivation is completed, F-10463a is extracted from the fungus and the culture medium using an organic solvent, such as acetone, acetonitrile, etc., with the same volume as the volume of the culture medium. The solid material present in the extraction solution is removed through centrifugation or filtration using diatomaceous earth. Then, the F-10463a present in the supernatant or filtrate is isolated by utilizing the physical and chemical properties and monitoring the inhibitory activity to sphingomyelinase. For example, the supernatant or filtrate can be concentrated to remove the organic solvent and then a different organic solvent, not miscible with water, such as *n*-butanol, methyl ethyl ketone, ethyl acetate, chloroform, ethylene chloride, methylene chloride, etc., or a mixture of these solvents, is added to extract the F-10463a present in the supernatant or filtrate. In a different method, a common absorbent, such as activated carbon or absorbent resin, such as amberlite XAD-2, XAD-4 (Rohm and Hass Co.), Diaion HP-10, HP-20, CHP-20P, HP-50 (Mitsubishi Kasei Co., Ltd.), etc., is used to absorb the F-10463a present in the solution onto an absorbent layer and remove the impurities, and then the absorbed F-10463a is further eluted with methanol/water, acetone/water, *n*-butanol/water, etc. The F-10463a thus obtained can be further purified with absorption chromatography using silica gel, Florisil, etc., distribution chromatography using Cephadesk LH-20 (Pharmacia Co.), gel-filtration chromatography using Cephadesk G-25 (Pharmacia Co.), as well as normal phase or reverse phase high-performance liquid chromatography.

The inhibitory activity against sphingomyelinase can be determined with the following method [*J. Lipid Res.*, **20**, 456 (1979)].

First, 10 μL of [N-methyl- ^{14}C] sphingomyelin (bovine, 52 mCi/mmol, 25 $\mu\text{Ci/mL}$, Pharmacia Co.) and 200 μL of sphingomyelin (bovine, 20 mM, Pharmacia Co.) are mixed and dried under a nitrogen flow. Then, 200 μL of 1 M Tris-hydrochloric acid buffer (pH 7.5), 40 μL of 10% (v/v) Triton X-100, 20 μL of 0.5 M MgCl_2 , and 1.24 mL of H_2O are added to the residue. The resulting mixture is incubated at 48°C for 30 minutes and then treated twice with ultrasonic irradiation using an ultrasonic probe with an output power of 20 W for 15 seconds to prepare a mixed micelle solution of [^{14}C]sphingomyelin.

The sphingomyelinase reaction is carried out by incubating, at 37°C for 40 minutes, a mixture containing 150 µL of the solution prepared above as the substrate, 10 µL of the sample solution, and 40 µL of microsome fraction (25,000 x g – 100,000 x g, protein concentration 3 – 4 mg/mL) prepared from Winster-Imamichi male rat brain as the enzyme solution. When the reaction is completed, the reaction mixture is extracted with 500 µL of a solvent mixture containing chloroform : methanol = 2:1 (v/v). The aqueous phase thus obtained, 150 µL, is then mixed with 3 mL of Picoflow TM-40 (Pacard Japan Co., Ltd.), and the amount of the reactant, [¹⁴C] phosphorylcholine, is determined on a liquid scintillation counter. The inhibitory activity against sphingomyelinase is obtained by further subtracting the value determined in the absence of MgCl₂, which is essential for the activity of sphingomyelinase.

Embodiment of the invention

In the following, this invention is explained in more detail with practical examples. However, these practical examples should not be considered as limitations of this invention.

Practical Example 1

Production and purification of F-10463a

(1) Cultivation

Dasyscyphus mollissimus (Lasch) Dennis, strain SANK13892, was inoculated under sterilized conditions into a sterilized 500-mL conical flask (seeding flask) containing 100 mL of a culture medium with the following composition. Then, the pre-cultivation was carried out on a rotary shaker at 200 rpm for 5 days.

Table 1

Composition of the culture medium

Glycerol	50 g
Potato	50 g
Yeast extract	5 g
Malt extract	5 g
Defoaming agent (CB-442)	0.2 g
Ion-exchanged water	1000 mL
pH no adjustment	

The main cultivation was carried out with the following procedure. The culture solution obtained from the pre-cultivation was added to 15 sterilized 500 mL conical flasks, 5 mL each, containing 100 mL of the culture medium described above. Then, the main cultivation was carried out at 23°C on a rotary shaker at 200 rpm for 7 days.

(2) Method for determining the inhibitory activity against sphingomyelinase

The standard enzyme sample of sphingomyelinase was prepared basically according to the method described by Gatt S. [*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 235 (1976)] In the method, rat brain was used as the source for sphingomyelinase. The rat brain microsome fraction was prepared with the following method. A total of 10 Wistar-Kimura male rats, 9 weeks old, were killed through bleeding from the carotid artery and the whole brain was taken out. After removing the cerebellum, the remaining part was rapidly placed in 130 mL of buffer A, previously cooled at 4°C and containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.1 mM leupeptide, 5 mM Tris-hydrochloric acid buffer (pH 7.4). The brain cells were lysed using a homogenizer. The mixture thus obtained was centrifuged at 4°C and 700 x g for 10 minutes. The supernatant was separated and further centrifuged at 4°C and 25,000 x g for 10 minutes. Finally, the supernatant was separated and centrifuged again at 4°C and 100,000 x g for 60 minutes. The precipitate was separated as the microsome fraction. Moreover, the microsome fraction was stored under frozen conditions in liquid nitrogen prior to the determination of the inhibitory activity against sphingomyelinase. Before use, the microsome fraction was diluted with buffer A to a protein concentration of 3 – 4 mg/mL.

The inhibitory activity against sphingomyelinase was determined with the method reported by Hostetler K. Y. And Yazaki P. J. using a mixed micelle solution [*J. Lipid Res.*, **20**, 456 (1979)]. Thus, 10 µL of [N-methyl-¹⁴C] sphingomyelin (bovine, 52 mCi/mmol, 25 µCi/mL, Pharmacia Co.) and 200 µL of sphingomyelin (bovine, 20 mM, Pharmacia Co.) were mixed and dried under a nitrogen flow. Then, 200 µL of 1 M Tris-hydrochloric acid buffer (pH 7.5), 40 µL of 10% (v/v) Triton X-100, 20 µL of 0.5 M MgCl₂, and 1.24 mL of H₂O were added to the residue. The resulting mixture was incubated at 48°C for 30 minutes and then treated twice with ultrasonic irradiation using an ultrasonic probe with an output power of 20 W for 15 seconds to prepare a mixed micelle solution of [¹⁴C]sphingomyelin.

The sphingomyelinase reaction was carried out by incubating, at 37°C for 40 minutes, a mixture containing 150 µL of the solution prepared above as the substrate, 10 µL of the sample solution, and 40 µL of microsome fraction prepared from Wistar-Kyoto male rat brain as the enzyme solution. When the reaction was completed, the reaction mixture was extracted with 500 µL of a solvent mixture containing chloroform : methanol = 2:1 (v/v). The aqueous phase thus obtained, 150 µL, was then mixed with 3 mL of Picoflow TM-40 (Pacard Japan Co., Ltd.), and the amount of the reactant, [¹⁴C] phosphorylcholine, was determined on a liquid scintillation counter. The inhibitory activity against sphingomyelinase was obtained by further subtracting the value determined in the absence of MgCl₂, which is essential for the activity of sphingomyelinase.

The inhibitory activity against sphingomyelinase determined with the method described above and expressed as the concentration of F-10463a at 50% inhibition was 20 µg/mL.

(3) Separation

The culture solutions obtained from 15 conical flasks were combined and 6 N hydrochloric acid was added to adjust pH = 3. Then, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The cell pellet thus obtained was added to 500 mL of 80% acetone and stirred for 1 hour. The resulting mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The supernatant obtained was concentrated under reduced pressure to remove the acetone. The residual mixture was extracted twice with an equal amount of ethyl acetate. The ethyl acetate layer was separated, washed with saturated brine, and dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was removed under reduced pressure to give 430 mg of a brown oily substance. The brown oil, 400 mg, was dissolved in a small amount of a solvent mixture containing methylene chloride : methanol = 100 : 1. The solution was loaded on a column filled with 80 mL of silica gel equilibrated with the same solvent mixture. Then, the column was eluted with 240 mL of a solvent mixture containing methylene chloride : methanol = 100 : 1, followed by solvent mixtures containing methylene chloride : methanol = 50 : 1, 20 : 1, and 10 : 1, 240 mL each. The fractions were collected. The enzyme inhibitory activity was observed in the fraction of 20 : 1. The fraction was concentrated to give 78 mg of a brown oily substance. The oily substance was further purified with HPLC under the following conditions. Thus, the oily substance, about 20 mg each, was loaded onto the HPLC column (Cosmosil 5 C18-AR, 20 Ø x 250 mm, Nakalitesk Co.) equilibrated with a solvent mixture of 70% acetonitrile-water and then eluted with the same solvent at a flow rate of

10 mL/min. The elution was monitored with UV absorption at 210 nm and the fraction eluted at about 30 minutes was collected. The fraction was concentrated under reduced pressure to give 22 mg of compound F-10463a.

Possible utilization in industry

The novel compound, F-10463a, disclosed in this invention, is useful as an anti-HIV agent, anti-diabetic agent, anti-arteriosclerotic agent, anti-osteoporotic agent, antithrombotic agent, anti-inflammatory agent, immunosuppressant, diuretic agent, or as a drug for the prevention and treatment of various other diseases, such as respiratory disease, thyroid disease, Alzheimer's disease, hepatitis, nephritis, leukemia, and cachexia.

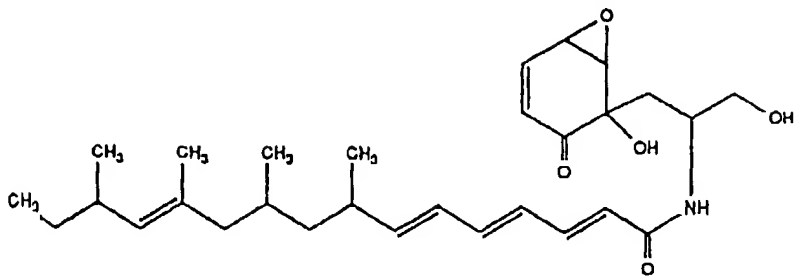
The drug composition of this invention useful for the prevention and treatment of the diseases described above contains a certain amount of F-10463a suitable to achieve a desirable efficacy and common pharmaceutical excipients. The drug composition of this invention can be formulated in various formulations, including oral formulations, such as tablet, capsule, granules, powder, syrup, etc., as well as other non-oral formulations, such as injection solution, drops, suppository, etc.

When used as an injection solution or drops, the drug composition of this invention can be a parenteral aqueous solution containing no pyrogen. The parenteral aqueous solution can be prepared according to the current technology while considering the pH value, isotonicity, and stability.

The administration method and dosage of the drug composition of this invention should be decided by physicians based on factors capable of affecting the efficacy of the active ingredient, including the symptoms, body weight, sex, age, and food uptake of patients, as well as the severity of disease, dosing interval, other clinical effects, etc. Usually, the oral dose for adults is in the range of about 0.01 mg to about 1000 mg per day administered once or in several portions. Moreover, the non-oral dose for adults is in the range of about 0.01 mg to about 100 mg once administered through subcutaneous injection, intramuscular injection, or intravenous injection.

Patent Claims

1. Novel compound F-10463a represented by the following formula.



2. A method for the preparation of F-10463a, characterized by separating F-10463a from a product mixture obtained by culturing a fungus strain, which is capable of producing F-10463a and belongs to *Dasyscyphus*.
3. The preparation method described in Claim 2, characterized by that the fungus strain, which is capable of producing F-10463a and belongs to *Dasyscyphus*, is *Dasyscyphus mollissimus* (Lasch) Dennis, strain SANK 13892 (FERM BP-4491).
4. A drug composition, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
5. An anti-HIV agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
6. An antidiabetic agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
7. An anti-arteriosclerotic agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.

8. An anti-osteoporotic agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
9. An antithrombotic agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
10. An anti-inflammatory agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
11. An immunosuppressant agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
12. A diuretic agent, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
13. An agent for the prevention and treatment of respiratory diseases, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
14. An agent for the prevention and treatment of thyroid diseases, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.
15. An agent for the prevention and treatment of Alzheimer's disease, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.

16. An agent for the prevention and treatment of hepatitis, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.

17. An agent for the prevention and treatment of nephritis, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.

18. An agent for the prevention and treatment of leukemia, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.

19. An agent for the prevention and treatment of cachexia, characterized by containing a certain amount of the compound described in Claim 1, suitable to achieve a desirable efficacy, and a pharmaceutically allowable carrier or excipient.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07D303/36, C12P17/02, A61K31/335

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07D303/36, C12P17/02, A61K31/335

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 3-157386 (Merck & Co., Inc.), July 5, 1991 (05. 07. 91) & EP, A1, 411703 & US, A, 5064856	1 ~ 19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

March 17, 1995 (17. 03. 95)

Date of mailing of the international search report

April 18, 1995 (18. 04. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)